

## 胰蛋白酶活性检测试剂盒

### Trypsase Assay Kit

微量法

货号：AK225

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK225-A	100 ml ×1 瓶	4℃保存；
AK225-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存。临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解；
AK225-C	20 ml ×1 瓶	4℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：胰蛋白酶 (Trypsase, Parenzyme) 选择性水解变性蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链，是一种重要的消化酶。此外，胰蛋白酶还广泛应用于脓胸、血胸、外科炎症、溃疡、创伤性损伤等所产生的局部水肿、血肿及脓肿等的辅助治疗。

原理：胰蛋白酶催化水解 BAEE 的酯键，生成 BA，BA 在 253nm 处有吸收峰，通过测定 253nm 吸光度增加速率，即可计算出胰蛋白酶的活性。

自备用品：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

组织样品：按照组织质量 (g)：AK225-A 体积 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK225-A) 冰浴匀浆，8000g，4℃离心 10min，取上清，即粗酶液，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 253 nm，蒸馏水调零。
2. 工作液的配制：将 AK225-B、AK225-C 按 2：97 配制工作液，按需配制，实验前置于 37℃ 水浴预热 30min。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板) 中依次加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
蒸馏水	2	
工作液	198	
迅速混匀于 253nm 测定 0s 和 60s 的吸光度 A1 和 A2， $\Delta A$ 空白 = A2-A1。		
粗酶液		2
工作液		198
迅速混匀于 253nm 测定 0s 和 60s 的吸光度 A3 和 A4， $\Delta A$ 测定 = A4-A3。		

注意：空白管只需做 1-2 次。

胰蛋白酶活性计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 1ml 体系下，37℃每毫克蛋白质每分钟催化 253nm 处吸光值增加 0.001 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div 0.001 \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times (V3 \div V4) \\ &= 10^5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

## 2. 按样本质量计算

活性单位定义：在 1ml 体系下，37℃每克组织每分钟催化 253 nm 处吸光值增加 0.001 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/g)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \times V \text{ 反总} \div (W \times V1 \div V2) \div T \times (V3 \div V4) \\ &= 10^5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W\end{aligned}$$

**注：** Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 mg/mL，需要另外测定；W: 组织质量(g)；V1: 加入反应体系中粗酶液体积(mL)，2 $\mu$ L=0.002mL；V2: 粗酶液总体积(mL)，1 mL；T: 反应时间(min)，1min；V3: 反应总体积，198 $\mu$ L+2 $\mu$ L=200 $\mu$ L=0.2mL；V4: 1 mL 体系。

## b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

### 1. 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 1ml 体系下，37℃每毫克蛋白质每分钟催化 253 nm 处吸光值增加 0.0005 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div 0.0005 \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times (V3 \div V4) \\ &= 2 \times 10^5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

### 2. 按样本质量计算

活性单位定义：在 1ml 体系下，37℃每克组织每分钟催化 253 nm 处吸光值增加 0.0005 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{胰蛋白酶 (U/g)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div 0.0005 \div (W \times V1 \div V2) \div T \times (V3 \div V4) \\ &= 2 \times 10^5 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W\end{aligned}$$

**注：** Cpr: 粗酶液蛋白质浓度(mg/mL)，需要另外测定；W: 组织质量(g)；V1: 加入反应体系中粗酶液体积(mL)，2 $\mu$ L=0.002mL；V2: 粗酶液总体积(mL)，1 mL；T: 反应时间(min)，1min；V3: 反应总体积，198 $\mu$ L+2 $\mu$ L=200 $\mu$ L=0.2mL；V4: 1 mL 体系。

## 注意事项：

1. 预实验保证吸光值变化在 0.01~0.1 之间。
2. 若所测结果  $\Delta A$  测定为负值，可适当将 AK225-B 稀释（2 倍或 4 倍）再进行实验。